

動物遺伝資源の特性評価のためのマイクロサテライト DNA の効率的単離法

【要約】 動物遺伝資源の特性評価に資するため、マイクロサテライト DNA のゲノム中コピー数が少ない家禽において、pCR-Script ベクター、点変異導入法および mung bean ヌクレアーゼを組み合わせることで、その効率的単離法を開発した。

農業生物資源研究所・遺伝資源第一部・動物探索評価研究チーム

連絡先

0298-38-7041

部会名	生物資源	専門	遺伝資源	対象	家禽類	分類	研究
部会名	畜産	専門	育種・遺伝	対象	家禽類	分類	研究

【背景・ねらい】

マイクロサテライト DNA は、数塩基の配列が繰り返しているもので、その代表として CA リピートがある。マイクロサテライト DNA は、各染色体に広く分布し、対立遺伝子 (allele) 数が多いことから遺伝子マーカーとして哺乳動物の遺伝解析に広く用いられている。ところが家禽においては、既知のマイクロサテライト DNA マーカーは少ない。また、家禽のマイクロサテライト DNA の 1 ゲノムあたりのコピー数は、哺乳動物の約 10 分の 1 と少なく、従来法では新たなマイクロサテライト DNA のクローニングにかなりの時間と労力を要する。本研究では、マイクロサテライト DNA を応用した動物遺伝資源の遺伝特性評価に資するため、マイクロサテライト DNA の効率的なクローニング法を開発する。

【成果の内容・特徴】

- ① 点変異導入法 (Kunkel ら、1988) の操作手順を哺乳動物のマイクロサテライト DNA のクローニングに応用した方法 (Ostrander ら、1992) を改変し、家禽のマイクロサテライト DNA の効率的なクローニング法を開発した (図 1)。
- ② この方法を用いた場合、表 1 のように Ostrander らの方法をそのまま家禽に応用した場合より、30 倍以上効率的にマイクロサテライト DNA を単離できる。
- ③ この方法では、PCR 産物クローニング用に開発されたプラスミドベクター pCR-Script (Stratagene) を使用することにより、脱リン酸化処理を施した DNA 断片のクローニング効率を上げ、さらに大腸菌 XL1-Blue MRF⁺ を使用することによって形質転換効率を上げた。これによって、プライマー伸長反応に供与するクローン数を飛躍的に増加させた。
- ④ CA リピートを含むクローンを選択する目的で、調製した一本鎖 DNA、(CA)₁₀ オリゴヌクレオチド、dNTP、耐熱性ポリメラーゼを混合し、高温下でプライマー伸長反応を行った。その後、一本鎖 DNA 特異的分解酵素である mung bean ヌクレアーゼを作用させることで、二本鎖 DNA の効率的な選別を可能とした。

【成果の活用面・留意点】

本法は、すべての動物種においてマイクロサテライト DNA の効率的クローニング法として応用できる。

[具体的データ]

図1 マイクロサテライト DNA のクローニング手順

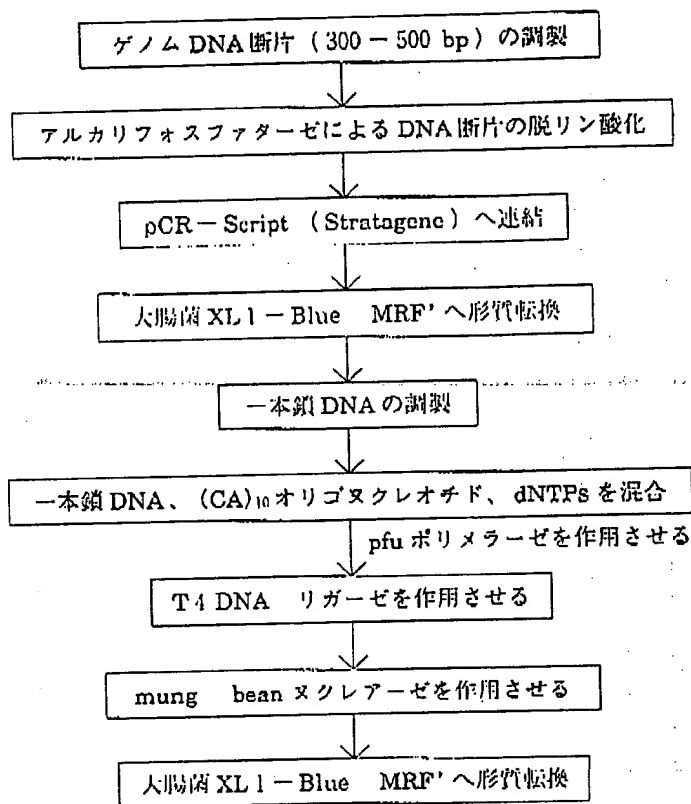


表1 これまでの方法との効率比較

	今回の方法	Ostrander らの方法*
(CA) _n 陽性クローンの割合	70%	2.1%
平均 CA 繰り返し回数	13.3 回	7.8 回

(* Cheng & Crittenden, 1994)

[その他]

研究課題名：動物遺伝資源評価のための DNA 多型マーカーの開発

予算区分：経常

研究期間：平成7年度（平成6～8年度）

研究担当：高橋秀彰・並澤圭二郎・古川 力

発表論文等：1) Takahashi *et al.* : An efficient method to clone chicken microsatellite repeat sequences. Japanese poultry science in press.

2) Takahashi *et al.* : Efficient cloning method to detect microsatellite markers in chickens. 第20回ベルツビルシンポジウム講演要旨 p32, 1995

3) 高橋ら：多型 DNA マーカーの効率的クローニング法の検討。第90回日本畜産学会大会講演要旨 p177, 1995

4) 高橋ら：ニワトリのマイクロサテライト DNA マーカー単離の効率化。平成7年度日本家禽学会秋季大会講演要旨 p11, 1995